Istituto di Fisiologia della R. Università di Padova
diretto dal Prof. A. STEFANI

Dottori G. MANCA e G. CATTERINA

Intorno al comportamento della resistenza dei globuli rossi nucleati del sangue conservato a lungo fuori dell'organismo

Estratto

dall'Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini

Anno I, Vol. I, Fasc. II.

Diretto dal **Prof. G. Colasanti**

Direttore dell'Istituto di Farmacologia e Chimica fisiologica
nella R. Università di Roma

Ufficio di Redazione ed Amministrazione
Via Depretis, 92, Roma

ROMA
Tipografia Fratelli Centenari
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 23 12

1902

Istituto di Fisiologia della R. Università di Padova
diretto dal Prof. A. STEFANI

Dottori G. MANCA e G. CATTERINA

Intorno al comportamento della resistenza dei globuli rossi nucleati del sangue conservato a lungo fuori dell'organismo

Estratto

dall'Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini

Anno I, Vol. I, Fasc. II.

Diretto dal **Prof. G. Colasanti**

Direttore dell'Istituto di Farmacologia e Chimica fisiologica
nella R. Università di Roma

Ufficio di Redazione ed Amministrazione
Via Depretis, 92, Roma

ROMA
Tipografia Fratelli Centenari
Via degli Avignonesi, 30-31
Telefono 23 12

1902

Istituto di fisiologia della R. Università di Padova
diretto dal Prof. A. STEFANI

Dottori G. MANCA e G. CATTERINA

Intorno al comportamento della resistenza dei globuli rossi nucleati del sangue conservato a lungo fuori dell'organismo

I. INTRODUZIONE.

Scopo del lavoro. — Questa Nota fa parte di un ciclo di lavori pubblicati da uno di noi intorno alla così detta " resistenza " ed ai fenomeni osmotici dei globuli rossi del sangue, in relazione con le condizioni fisiologiche dei medesimi (**1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**).

Alcuni di tali lavori riguardano più specialmente le variazioni della così detta " resistenza " dei globuli rossi del sangue tenuto, per un tempo più o meno lungo, fuori dell'organismo e sottoposto a condizioni tali da alterare grandemente o distruggere completamente la vitalità dei medesimi (**2**, **3**, **4**, **5** e **6**). Punto di partenza di tutte queste ricerche fu un'affermazione dell'Hamburger, secondo il quale l'andamento dei fenomeni della così detta " resistenza " del sangue, rendevano possibile il differenziare i globuli rossi vivi dai globuli rossi morti, attribuendo ai primi la proprietà di comportarsi, rispetto alle soluzioni saline, in conformità alla legge dei coefficenti isotonici, e negando tale proprietà ai globuli rossi morti. Per non allungare eccessivamente questa Nota, rimandiamo ai lavori citati, (e principalmente al **3**, **4**, **5** e **6**) per quanto concerne lo scopo di queste esperienze e i criteri generali ai quali sono informate.

Qui basterà aggiungere che, mentre le precedenti ricerche erano limitate ai globuli rossi non nucleati di alcuni mammiferi, il sangue dei quali con maggiore facilità si può procurare nei nostri laboratori, con questa Nota s' inizia la pubblicazione di una serie di ricerche, analoghe a quelle pubblicate nei lavori citati, condotte sui globuli rossi nucleati del sangue di animali a sangue freddo o di uccelli che più facilmente potemmo avere a nostra disposizione.

Le ricerche pubblicate in questa Nota non sono che una ripetizione esatta, per i globuli rossi nucleati, di quelle già pubblicate da uno di noi nel primo suo lavoro (**3**) intorno alla resistenza del sangue conservato fuori dell'organismo, e condotte su globuli rossi non nucleati. In tal lavoro le ricerche furono limitate a questo solo punto : verificare l'affermazione di Hamburger secondo il quale i globuli rossi del sangue (di bue) conservato per tre giorni fuori dell'organismo non seguono più, quando vengano messi a contatto con soluzioni saline, la legge dei coefficenti isotonici. Il risultato fu che i globuli rossi non nucleati del sangue (di bue, pecora, cane) conservati fuori dell'organismo, senza precauzioni asettiche, diminuiscono progressivamente di resistenza rispetto alle soluzioni di NaCl, seguendo per altro sempre le leggi della forza osmotica (*) non solo dopo 3 giorni dall'estrazione dei vasi sanguigni, ma anche dopo 4 giorni.

(*) Vedi intorno a questo punto le particolarità indicate nella nota 2a a pag. 2 della Memoria 5, che riporteremo, per comodità di quei lettori che non avessero a mano tale lavoro : « Sarà bene, per maggior chiarezza, esporre esattamente le leggi cui alludo. Aggiungendo ad egual volume di soluzioni di una sostanza (indifferente verso i globuli rossi, per es. di NaCl) progressivamente concentrate, un eguale volume di sangue, si vede che nelle soluzioni più diluite i globuli vengono distrutti completamente, cominciano a conservarsi in quelle di una certa concentrazione, e sono completamente conservati in quelle più concentrate. Paragonando la colorazione che assumono le soluzioni in questione, si veggono molto colorate quelle in cui i globuli sono tutti distrutti, sono incolore quelle in cui i globuli sono tutti completamente conservati. Se si tratta di soluzioni la cui concentrazione cresce gradatamente (per es. come nelle mie esperienze del 0,10 o del 0,25 per mille dall'una all'altra) e se si sono misurate con esattezza le quantità di soluzione e quelle di sangue, andando dalle soluzioni più diluite a quelle concentrate si ha nelle tinte rispettive una scala cromatica regolarissima in cui si passa progressiva-

Nelle esperienze che formano l'oggetto di questa Nota si studia il medesimo problema per quanto concerne i globuli rossi nucleati, determinando il loro comportamento, rispetto alle leggi della forza osmotica, quando il sangue, estratto dai vasi sanguigni, viene conservato fuori dell'organismo per un tempo variabile di 2-3-4-5 giorni, ecc.

II. METODI SPERIMENTALI.

Per lo studio del comportamento dei globuli rossi verso le soluzioni di NaCl si usarono esattamente i medesimi metodi di esperimento e di notazione dei risultati indicati nella Memoria **3** pag. 2-3-4. Si tenne inoltre conto degli ulteriori perfezionamenti nella tecnica indicati a pag. 25-28 della Memoria **4** e a pag. 29-30 della Memoria **5**.

mente dai toni del roseo, a quelli del citrino, fino ad arrivare alla mancanza assoluta di colorazione. Questo fatto si osserva per il sangue di tutti gli animali e per le sostanze (che non agiscono chimicamente sui globuli rossi) finora studiati e ad esso corrisponderebbe una legge che io per brevità chiamerò « legge della scala cromatica ».

Se invece di studiare soluzioni di una medesima sostanza, si studiano comparativamente soluzioni di sostanze diverse, si trovano i fatti descritti per la prima volta da Hamburger che sono regolati dalla così detta « legge dei coefficenti isotonici » legge per la prima volta enunciata da De Vries a proposito dell'azione delle sostanze indifferenti sulla plasmolisi delle cellule vegetali. Per maggior semplicità e precisione ad un tempo, mi riferirò costantemente a queste denominazioni nel corso del lavoro, intendendo sempre come « legge della scala cromatica » quanto si osserva nelle soluzioni di una medesima sostanza, e come « legge dei coefficenti isotonici » quello che si riferisce a soluzioni di sostanze diverse.

Tanto i fatti corrispondenti a queste due leggi, quanto quelli che si osservano studiando l'azione di soluzioni di diversa concentrazione sulle cellule vegetali coi vari metodi indicati da De Vries (7, pag. 465) e sui globuli rossi col metodo dell'ematocrito, rientrano tutti nella legge unica che si può chiamare « legge della pressione osmotica » alla quale per brevità mi riporterò nel testo quando intenderò considerare tutti questi fenomeni nella loro espressione generale. In un mio precedente lavoro (4) ho svolto a lungo le dottrine fisico-chimiche della pressione osmotica, e rimando ad esso per maggiori particolari ».

Per comodità dei lettori che non avessero presenti i lavori citati, riportiamo in breve le norme da noi adottate.

Il sangue che doveva servire per le esperienze, appena tolto dal cuore o dai vasi sanguigni, veniva subito defibrinato in contatto dell'aria, e filtrato su garza. Trattandosi di ripetizione delle esperienze (pubblicate nella Nota 3) eseguite su sangue di mammiferi conservato fuori dell'organismo senza cautele asettiche, si tralasciarono queste cautele anche per il sangue di queste esperienze. Per impedire la rapida distruzione dei globuli che si nota in queste condizioni, si cercò in alcune serie di esperienze di rallentare questo processo emolitico che avviene *in vitro*, mediante trattamento con CO e conservazione alla temperatura di 0°. - Su questi due modi di rallentare la distruzione globulare, uno di noi ha già diffusamente scritto nella Memoria 6, pag. 27 e 29 ; alla quale rimandiamo anche per il significato biologico da attribuirsi ai trattamenti del sangue con CO. Abbiamo anche provato a conservare il sangue in presenza di pezzettini di canfora, con la speranza che i processi di putrefazione e di emolisi venissero parimenti rallentati, ma i risultati furono negativi. In un altro modo ancora si cercò in qualche serie di esperienze di diminuire la rapidità dell'emolisi, vale a dire conservando il sangue dopo averne, mediante centrifugazione più o meno prolungata, separato e tolto una discreta quantità di siero ; anche per questo processo, rimandiamo nella citata Memoria 6, pag. 28-29 nota 2.ª - Ci servimmo di tubi d'assaggio perfettamente uguali per qualità e spessore di vetro, per diametro e per altezza ; in ognuno si mettevano 5 cc. delle soluzioni di NaCl misurate con provetta graduata che indicava $^1/_4$ di cc. In ogni tubo d'assaggio si facevano poi cadere una o due goccie di sangue (come sarà espressamente indicato a proposito delle singole esperienze) usando lo stesso conta goccie ; dopo si agitavano i miscugli dolcemente per due o tre volte, si tappavano i tubi d'assaggio ed i miscugli e si lasciavano riposare. Da un'esperienza all'altra i tubi d'assaggio venivano lavati bene con acqua comune, con soluzione concentrata di NaOH, poi a lungo con H_2O, poi con alcool e finalmente con etere ; si mettevano poi in istufa a 100°-110° per mezza ad un'ora, e si lasciavano raffreddare sotto campana ad acido solforico. Siamo stati indotti a curare in tal modo l'assoluta privazione di H_2O nelle pareti interne di questi tubi, per evitare le gravi anomalie che senza tante precauzioni si verificherebbero.

Abbiamo usato tante precauzioni per poter avere dei dati attendibili nel confronto colorimetrico minuzioso tra le due o più serie di provette contenenti sangue normale o sangue estratto da maggior o minor tempo dei vasi sanguigni, giacchè non ci siamo accontentati di stabilire quei punti (soluzione in cui comincia a vedersi colorazione del liquido, soluzione in cui tutti i globuli vengono distrutti, soluzione in cui tutti i globuli vengono conservati, ecc.) su cui fissavano ordinariamente la loro attenzione gli Autori che si occuparono di questo ordine di studi, ma abbiamo sempre fatto un paziente e diligente esame di confronto tra le provette di una stessa serie e tra quelle aventi eguale concentrazione in NaCl nelle due o più serie.

I tubi d'assaggio venivano lasciati a sè ed esaminati dopo un tempo variabile, indicato espressamente nelle singole esperienze. Anche nel caso di queste esperienze su globuli di sangue più o meno « vecchio » (servendoci di questa espressione per indicare il sangue conservato fuori dell' organismo per un tempo più o meno lungo) ci dovemmo preoccupare della così detta « resistenza del residuo » intorno alla quale ha già richiamato l' attenzione uno di noi in alcune delle sue pubblicazioni precedenti. Nella prima Memoria **3**, pag. 4, si affermava: « In queste ricerche bisogna inoltre tener conto di un altro fattore, cioè di quello che brevemente chiamerò *resistenza del residuo.* Anche questa nel sangue lasciato a sè stesso va rapidamente decrescendo in modo che l'esame delle soluzioni non si può più praticare dopo 15-20 ore, perchè il residuo si può trovare allora in gran parte distrutto. Nel sangue lasciato a sè stesso per 6-7 giorni si può osservare discreta distruzione del residuo anche dopo 6 ore solamente. Ma nemmeno questo fatto credo si possa mettere in relazione con la cessata vitalità dei globuli, perchè non è altro che l'esagerazione di un fenomeno che normalmente si osserva nel sangue di alcune specie animali; così mentre nelle prove con sangue (di bue) freschissimo, i globuli che fin dal principio resistono alle soluzioni saline, si conservano in seguito intatti anche per più di 24 ore, il sangue di pecora anche nelle medesime condizioni presenta alterazioni già dopo 16-18 ore. Questa rapida diminuzione della « resistenza del residuo » costituisce una grande difficoltà sull'esame delle soluzioni saline, cui s'aggiunse sangue tolto da molto tempo dall' organismo, perchè dopo un certo tempo si ha che i globuli che in un primo periodo resistono alle soluzioni e tendevano a cadere lentamente in fondo, cominciano a di-

struggersi prima ancora di essersi in totalità deposti. Nelle mie esperienze ho cercato sempre - esaminando per 2-3 volte le soluzioni ad intervalli variabili - come trovasi dettagliatamente indicato in seguito, di evitare questa causa di errore. » E nella Memoria **4**, pag. 27-28 si scriveva : « Nelle esperienze precedenti una delle difficoltà principali era costituita dal fatto della grande diminuzione di quella che ho chiamato *resistenza del residuo.* Intorno a questo fenomeno diedi qualche cenno nella Nota precedente (**3**) e conto di ritornare fra breve in modo speciale. In questa serie di esperienze ho cercato di evitare questa causa di errore accelerando il depositarsi dei globuli rimasti intatti, mediante la centrifugazione. Mentre nei miscugli, delle soluzioni saline con le goccie di sangue, lasciati a sè, il deposito completo dei globuli non si ha che dopo 10-12 ore, cioè dopo un tempo in cui in certe condizioni è già molto copiosa la distruzione del residuo, si ha invece dopo 10-15 minuti se i miscugli vengono sottoposti alla centrifugazione ».

Anche nelle esperienze che formano oggetto di questa pubblicazione abbiamo cercato di ridurre al *minimum* la suddetta causa d'errore da ascriversi alla progressiva diminuzione della « resistenza del residuo » esaminando in varie riprese i miscugli di sangue con le soluzioni saline, sia affrettando il depositarsi dei globuli rimasti intatti, mediante la centrifugazione e a questo metodo rapido di esame ricorremmo specialmente nel caso di sangue già molto vecchio, per i globuli del quale era appunto maggiormente da temersi la grande diminuzione della « resistenza del residuo. » Tutto quanto precede intorno alla « resistenza del residuo » ed ai fatti relativi osservati, hanno stretto rapporto con osservazioni analoghe fatte in parte precedentemente, in parte contemporaneamente, da Malassez e da alcuni suoi allievi o collaboratori (**8**, **9**, **10**, **11**, **12** e **13**).

Le soluzioni di NaCl venivano preparate con tutte le cure indicate nella Memoria **4**, pag. 25-26, conservate sempre all'oscuro, e, da una esperienza all'altra, col tappo accuratamente paraffinato. Di tanto in tanto si verificava il titolo. In tutte le esperienze, oltre alle solite soluzioni al 2-3-4 per mille destinate a stabilire il decorso dell'emolisi prodotta dalle soluzioni molto diluite, che differivano tra di loro del 0,10 o 0,25 per mille di NaCl, se ne usava una anche al 20 per mille, la quale nel breve tempo che duravano le manualità di aggiunta delle goccie di sangue, di mescolamento e di centrifugazione doveva

conservare i globuli rossi ancora intatti, e doveva servire per indicare la quantità di emoglobina libera contenuta, prima del miscuglio con le soluzioni di sale, nel sangue vecchio o nella rispettiva poltiglia globulare. Così si aveva anche un concetto del decorso e della intensità della distruzione dei globuli rossi nel sangue *vecchio*.

Anche per quanto riguarda l'esame dei miscugli di sangue con le soluzioni di NaCl, dopo un certo tempo, o dopo la centrifugazione, e per quanto riguarda il modo di esprimere i risultati di tale esame, rimandiamo alle indicazioni già date da uno di noi nelle Memorie citate, e specialmente nella 5, pag. 29-30 (*).

Nella maggior parte dei casi, si fece anche un accurato esame microscopico del sangue *vecchio*, o della rispettiva poltiglia globulare, nonchè dei vari miscugli di sangue con le soluzioni di NaCl.

(*) Per comodità dei lettori che non avessero presenti tali lavori, riportiamo brevemente quanto è indispensabile per comprendere i nostri metodi di esame:

« Per rendere più facilmente confrontabili i risultati, adottai uno schema dei casi possibili, distinguendo 10 gradazioni; andando dalle soluzioni meno concentrate di NaCl alle più concentrate, si avrebbero i seguenti tipi (nell'esame fatto per es. dopo 15-24 ore, o dopo centrifugazione sufficiente):

9. Soluzione limpida, trasparente, rosea; non esiste alcun accenno a residuo di globuli nel fondo;
8. diminuisce l'intensità della colorazione, minima traccia di residuo;
7. diminuisce ancora l'intensità della colorazione, in fondo scarsissimo residuo;
6. colorazione leggermente rosea, in fondo residuo scarso;
5. diminuisce l'intensità della colorazione, aumenta il residuo;
4. colorazione rosea leggierissima, residuo discreto;
3. colorazione citrina, residuo abbondante;
2. liquido leggermente citrino, aumenta il residuo;
1. colorazione citrina leggierissima, residuo ancora maggiore;
0. liquido perfettamente incoloro; residuo al *maximum*.

I numeri d'ordine dei vari tipi descritti indicherebbero grossolanamente le quantità relative di emoglobina ceduta dai globuli alle soluzioni di NaCl: nel tipo 9 si avrebbe totale passaggio dall'Hb nella soluzione salina, in quello 0 si avrebbe completa conservazione dei globuli. Fissato così lo schema dei casi possibili, cercavo di far rientrare ciascuna soluzione in uno dei tipi descritti, oppure in un sottotipo intermediario tra due già descritti. Per rendere più evidenti i risultati così ottenuti, ho tentato di rappresentarli graficamente, mettendo nella linea delle ascisse

III. ESPERIENZE.

Riporteremo, brevissimamente riassunte, le varie serie di esperienze fatte, concedendo qualche estensione alle serie in cui la conservazione del sangue durò più a lungo.

Serie I, 31 maggio 1898. — Da un pollastro normale, mediante taglio del cuore, si ottengono circa 20 cc. di sangue che si defibrina e si filtra. Si fa subito una prova della resistenza (esperienza *A*); il resto del sangue si conserva in ghiacciaia. Il 1° giugno si toglie il sangue dalla ghiacciaia, gli si lascia prendere lentamente la temperatura dell'ambiente, e quindi serve per un'altra prova sulla resistenza (esperienza *B*); il resto si rimette in ghiacciaia. Il 2 giugno, si fa con le solite cautele, una nuova prova di resistenza (esperienza *C*). Il 3 giugno, con le solite cautele, si fa una nuova prova sulla resistenza (esperienza *D*).

Esperienza A. Sangue freschissimo. Si mette una goccia di sangue, in cc. 5 delle soluzioni saline di NaCl dal 3,2 al 7 per mille. Si seguono le manualità e le norme già indicate. I miscugli si lasciano a sè per ore 19 e mezza, poi si passa all'esame colorimetrico. Crediamo inutile riportare la tabella dei resultati, che furono regolari e senza alcuna anomalia; basta dire che la conservazione completa dei globuli si ebbe nella soluzione al 4,8 per mille, e che quelle più concentrate erano assolutamente incolore.

Esperienza B. Medesimo sangue, estratto da *28 ore* (*). Si usano le

i titoli delle soluzioni saline adoperate, in quelle delle ordinate il numero del tipo schematico assegnato a ciascuna soluzione, e ottenendo così la curva della resistenza dei globuli rispetto a quelle date soluzioni.

Se in una serie di esperienze si seguono sempre esattamente gli stessi criteri, e gli esami delle soluzioni sono fatti sempre da una medesima persona, si possono confrontare tra loro anche le curve appartenenti a gruppi di provette studiati e paragonati in epoche diverse. Ottenuta la grafica dei risultati di una data esperienza, per evitare la pubblicazione di un gran numero di grafiche o di dettagli di esperimento in molti casi ho trasformato le rappresentazioni grafiche in rappresentazione numerica, calcolando dalla grafica la concentrazione delle soluzioni di NaCl corrispondenti ai vari tipi adottati, ed evitando così la complicazione di dover confrontare soluzioni rientranti in un sotto-tipo intermediario, ecc. » (5, pagina 29-30).

(*) Il tempo si calcolerà sempre a cominciare dal momento in cui si toglie il sangue dal cuore o dai vasi sanguigni.

soluzioni di NaCl dall' 1, 2 al 7 per mille. Si seguono le solite norme; e si fa l'esame colorimetrico ore 10 e un quarto dopo l'aggiunta del sangue alle soluzioni saline. Si tralasciano i risultati numerici che furono regolari e senza alcuna anomalia; basti dire che la conservazione dei globuli cominciò nella soluzione al 2,8 per mille, e che erano completamente conservati nella soluzione al 4,4. Le soluzioni più concentrate di quest'ultima, erano assolutamente incolore. - In confronto ai globuli dell'esperienza *A*, si ebbe leggiera diminuzione verso le soluzioni al 3,2 e al 3,6 per mille e un leggiero aumento verso la soluzione al 4,4 per mille.

Esperienza C. Medesimo sangue, estratto da *ore 51*; si presenta di odore normale, colore rosso-scuro, che diventa più chiaro agitando il sangue all'aria, ma non tanto chiaro come il sangue normale. Per la prova della resistenza si usa il sangue così ossigenato. Servono, con le solite manualità, le soluzioni di NaCl dal 2,4 al 7 per mille. Dopo ore 10 e mezzo si passa all'esame colorimetrico. I risultati furono esattamente eguali a quegli indicati per il sangue dell'esperienza precedente, coincidono le descrizioni delle colorazioni e dei residui, nonchè i tracciati grafici e le cifre delle rispettive tabelle.

Esperienza D. — Medesimo sangue, estratto da 72 *ore*; si presenta di odore normale, e di colore un poco più scuro di quello dell'esperienza precedente; diventa più chiaro sbattendolo all'aria. Per le prove della resistenza serve il sangue così ossigenato. Servono le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente, e le stesse manualità. Per altro si passa subito alla centrifugazione dei miscugli, e quindi all'esame colorimetrico (che si fa 1 ora e 5' dopo l'aggiunta del sangue alle soluzioni di NaCl). - Tralasciando i dati numerici, basti dire che si ebbero risultati sempre regolari, ed eguali a quelli della esperienza precedente fino alle soluzioni al 3,6 per mille; per le altre soluzioni, la colorazione andava regolarmente e gradatamente decrescendo e conservandosi sempre superiore a quelle dello stesso titolo dell'esperienza precedente, senza mai scomparire; la colorazione citrina leggiera della soluzione al 7 per mille indicava appunto che nel sangue esistevano già sciolte discrete quantità di emoglobina.

Serie II, 3 giugno 1898. — Da 4 anguille si leva il sangue del cuore; si defibrina e si filtra. Si fa subito una prova sulla resistenza (esperienza *A*), e il resto del sangue si conserva in ghiacciaia. Il

4 giugno con le solite cautele si fa una seconda prova sulla resistenza (esperienza *B*), poi il sangue si rimette sulla ghiacciaia. Il 6 giugno si fa una terza prova sulla resistenza (esperienza *C*), poi il sangue si conserva nella ghiacciaia, fino ad una quarta prova sulla resistenza, che si pratica il 17 dello stesso mese (esperienza *D*).

Esperienza A. Sangue freschissimo. Si mette una goccia di sangue in 5 cc. delle soluzioni di NaCl dall' 1 al 7 per mille. Si lasciano a sè questi miscugli, per ore 10 e un quarto, poi si passa all'esame colorimetrico. Tralasciando i dati numerici, basti dire che i risultati furono regolari e senza alcuna anomalia.

Esperienza B. — Medesimo sangue, estratto da *ore 28*. Si usano, con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dal 2 al 6, e inoltre quella al 20 per mille. Si centrifugano i miscugli, e dopo 1 ora e 15 minuti si passa all'esame colorimetrico. Tralasciando i dati numerici, basti dire che i risultati furono regolari e senza alcuna anomalia, e che rispetto al sangue dell'esperienza precedente, si ebbe una leggierissima diminuzione di resistenza, equivalente in media a variazioni del 0,3 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl. Anche la soluzione al 20 per mille era colorata ultra leggierissimamente in citrino, indizio di traccie di Hb già sciolta nel sangue.

Esperienza C. — Medesimo sangue, estratto da *80 ore*; ha odore normale, senza minimo accenno a putrefazione, colore rosso un po' più scuro del normale. Si usano, con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dal 2 al 7 per mille, e quella al 20. Centrifugazione, ed esame colorimetrico dopo 1 ora (dall'aggiunta del sangue alle soluzioni). I risultati furono identici a quelli dell'esperienza precedente, anche per quanto riguarda la soluzione al 20 per mille; sicchè dall'esperienza *B* a questa esperienza si ebbe come un arresto nell'emolisi (nel sangue puro) e nella diminuzione della resistenza dei globuli. - Del sangue puro di questa esperienza e degli indicati miscugli con le soluzioni di NaCl, si fa un accurato esame microscopico. Riporteremo il reperto di alcune soluzioni. Nella soluzione al 20 per mille i globuli hanno colorito e forma normale, i margini debolmente raggrinzati, nucleo poco appariscente. Nella soluzione al 2 i globuli sono un po' più pallidi, a forme irregolari, con nucleo più manifesto, non sono rari i globuli completamente scolorati (ombre). Nella soluzione al 2,4 i globuli sono un po' più pallidi dei normali, ma meno di quegli della soluzione al 2 per mille; hanno forma quasi normale, ed il nucleo è un po' meno

appariscente che non nella soluzione al 2. Nella soluzione al 3,20 i globuli hanno forma ancora più vicina alla normale, colorito più intenso di quelli della soluzione al 2,4. Nella soluzione al 4,40, i globuli hanno forma e colorito quasi normali, il nucleo poco appariscente. Nella soluzione al 5,60 per mille, i globuli si presentano come i normali.

Esperienza D. Medesimo sangue conservato da *ore 344*; ha colore rosso molto scuro, odore fetido; all'esame microscopico si vedono numerosissimi i globuli rossi ad aspetto normale. Per la resistenza, si usano con le solite modalità le soluzioni di NaCl dall' 1,2 al 7 per mille e quella al 20. Centrifugazione, ed esame dopo 1 ora. L'esame colorimetrico non dà alcun risultato: le soluzioni sono tutte egualmente colorate in roseo, e in fondo è un residuo biancastro eguale presso a poco in tutte. — Si fa accuratamente l'esame microscopico del contenuto dei vari miscugli, dopo aver bene rimescolato. Nella soluzione all' 1,2 per mille non si vedono che detriti e nuclei; e così nella soluzione al 2,6. In quella al 3,6 si vedono abbondanti detriti e numerose emazie incolore con nucleo ben evidente, e così nella soluzione al 4,8. Nella soluzione al 6 si vede qualche globulo rosso di colorito e aspetto come normale, alcuni a forma ellittica normale, altri a forma circolare. Nella soluzione al 7 aumentano leggermente di numero le emazie ben conservate; ve ne sono anche a forma circolare. Nella soluzione al 20 sono numerosissimi i corpuscoli rossi ben conservati.

Serie III, 7 giugno 1898. — Si leva sangue dal cuore di una gallina; si defibrina e si filtra. Si procede subito ad una prova sulla resistenza (esperienza *A*) ed il resto del sangue si conserva nella ghiacciaia. Il giorno 8 si procede ad una seconda prova sulla resistenza (esperienza *B*), e si mette il sangue nella ghiacciaia. Il giorno 16 si procede ad una terza prova sulla resistenza (esperienza *C*); una quarta prova (esperienza *D*) si pratica il giorno 18.

Esperienza A. Sangue freschissimo. Si usano, con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dal 2 al 4,8 per mille, e quella al 20. Si centrifugano i miscugli e quindi si passa all'esame colorimetrico. — Tralasciando i dati numerici basti dire che i risultati furono regolari e senza alcuna anomalia; i globuli si cominciavano a conservare già nelle soluzioni al 2 ed erano completamente conservati nella solu-

zione al 4. Questa soluzione e le seguenti, erano assolutamente incolore, indizio di assenza nel sangue di Hb sciolta. — Dopo l' esame colorimetrico si passa ad un minuzioso esame microscopico dei miscugli, dopo averli ben rimescolati. Nella soluzione al 2 le emazie sono rare, e di queste alcune sono incolore, altre colorate debolmente, altre del colore normale. Nella soluzione al 2,4 aumenta leggermente il numero dei globuli, e di quelli ben conservati; se ne veggono ancora incolori, e debolmente colorati. Nella soluzione al 2,8 aumenta ancora il numero dei globuli, e di quelli ben conservati; se ne veggono ancora debolmente colorati, a varie intensità di tinte fino a quelli dal colore normale. Nella soluzione al 3,20 sono ancora più numerosi i globuli, e quelli ben conservati; se ne veggono ancora, benchè in numero minore, di quelli debolmente colorati. Nella soluzione al 4,8 per mille i globuli ben conservati sono numerosissimi; se ne veggono incolori o debolmente colorati.

Esperienza B. — Medesimo sangue, estratto da *30 ore*; ha colore rosso di poco più oscuro del normale, odore normale. Si usano, con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dall' 1,6 al 4,8, e quella al 20 per mille. Esame con le solite norme. - Tralasciando i dati numerici, basti dire che i risultati furono regolari, senza alcuna anomalia. Si ebbe una leggiera diminuzione della resistenza: la conservazione dei globuli cominciò nella soluzione al 2,4 per mille, ed era completa nella soluzione al 4,4; quest' ultima soluzione e le seguenti erano assolutamente incolore, indizio di assenza di Hb sciolta nel sangue.

Esperienza C. Medesimo sangue estratto da *ore 221*. Si usano, con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dall' 1,8 al 5,8 per mille, e quella al 20. L'esame colorimetrico dà risultati regolari, ma poco evidenti, per la scarsezza dei globuli ancora conservati, nel sangue. - Dopo la centrifugazione i miscugli si rimescolano bene e si procede ad un minuzioso esame microscopico. Nella soluzione all' 1,8 per mille si vedono numerosi nuclei, intorno ai quali non è possibile scorgere protoplasma. Nella soluzione al 2,6 per mille, attorno a nuclei simili si riesce a distinguere il protoplasma incoloro, poco evidente, delle emazie, (con conservazione della forma caratteristica). Nella soluzione al 3,4 aumentano di numero i nuclei attorno ai quali è visibile il protoplasma incoloro delle emazie, un po' più evidente; si vedono anche emazie scolorate in cui è pochissimo evidente il nucleo: inoltre si

veggono rari globuli rossi di aspetto e colore come normale, con nucleo poco evidente. Nella soluzione al 4,2 per mille sono aumentati di molto in numero i globuli rossi di aspetto normale; e così progressivamente e regolarmente nelle soluzioni al 5, al 5,4, al 5,8 per mille. Nella soluzione al 20 per mille il numero delle emazie d'aspetto e forma normale è molto superiore a quello delle soluzioni precedenti; inoltre si vede qualche globulo rosso di forma circolare.

Esperienza D. Medesimo sangue estratto da *ore 269*. Esame microscopico del sangue puro e del miscuglio con soluzione NaCl al 20 per mille : non si riesce a vedere che detriti e nuclei.

Serie IV, 8 giugno 1898. — Si leva il sangue dal cuore di un piccione ; si defibrina e si filtra. Si procede subito ad una prova sulla resistenza (esperienza *A*), e il resto del sangue si mette nella ghiacciaia. Il 14 giugno si procede ad una nuova prova (esperienza *B*) e si rimette il resto nella ghiacciaia. Una terza prova si fa il giorno 15 (esperienza *C*).

Esperienza A. Sangue freschissimo. Con le solite modalità, si usano le soluzioni di NaCl dall' 1,6 al 4,8 per mille, e la soluzione al 20. Centrifugazione, e quindi l'esame colorimetrico. Questo dà risultati regolari, senza alcuna anomalia : tralasciando i dati numerici, basti dire che la conservazione delle emazie comincia nella soluzione al 3,2 e che nelle soluzioni più concentrate la colorazione va gradatamente diminuendo, senza scomparire per altro nemmeno in quella al 20 per mille, che si presenta ultra leggierissimamente rosea, indizio questo di discreta quantità di Hb già sciolta nel sangue, forse in seguito alla defibrinazione.

Esperienza B. Medesimo sangue, estratto da *ore 150*. Si usano soluzioni di NaCl dall' 1,8 al 5 per mille, e quella al 20. Solite modalità. Centrifugazione ed esame colorimetrico; questo indica distruzione completa nelle soluzioni fino al 5 per mille, scarso residuo in quella al 20 per mille. — Si rimescolano i miscugli e si procede a minuzioso esame microscopico. Nella soluzione all' 1,8 si vedono numerosi nuclei, intorno a molti dei quali si riesce a vedere con difficoltà la stroma perfettamente incoloro ; non si riesce a trovare alcun globulo colorato ; e così nella soluzione al 2,2. Nella soluzione al 2,6 le *ombre*, pur essendo assolutamente incolore sono più evidenti ; e

così nelle soluzioni al 3 e al 3,4. Nella soluzione al 3,8 sono numerose le *ombre* ancora più evidenti, ma incolore. Nella soluzione al 4,2 aumenta ancora il numero e l'evidenza delle *ombre*; e altrettanto nelle soluzioni al 4,6 e al 5 per mille; in nessuna si riesce a trovare globuli colorati. Nella soluzione al 20 per mille sono invece numerosissimi i globuli rossi simili ai normali per forma, aspetto e colore, e rare le *ombre*.

Esperienza C. Medesimo sangue, estratto da *ore 168*. Risultati in tutto analoghi a quelli indicati per l'esperienza precedente.

Serie V, 10 giugno 1898. — Sangue del cuore di una testuggine; si defibrina e si filtra. Si procede subito ad una prova sulla resistenza (esperienza *A*) e il resto del sangue si conserva in ghiacciaia. L' 11 si procede ad una seconda prova (esperienza *B*).

Esperienza A. Sangue freschissimo. Si usano con le solite modalità le soluzioni di NaCl dall' 1,6 al 6 per mille, e quella al 20. Centrifugazione ed esame colorimetrico.

Nella soluzione all' 1,6 i globuli erano in gran parte conservati, completamente conservati nella soluzione al 2,6.

Esperienza B. Medesimo sangue, estratto da *20 ore*. Soluzione di NaCl dall' 1 al 3,4, e quella al 20 per mille. I globuli cominciano a conservarsi nella soluzione all' 1,6, e sono completamente conservati in quella al 2,6.

Serie VI, 22 giugno 1898. — Sangue del cuore di una testuggine. Si defibrina e si filtra. Si procede subito ad una prova sulla resistenza (esperienza *A*); il sangue rimasto si satura con CO e si conserva in ghiacciaia. Il giorno 5 luglio si procede ad una nuova prova (esperienza *B*).

Esperienza A. Sangue freschissimo. Si usano con le solite modalità, le soluzioni di NaCl dall'1 al 3, 4 e 20 per mille. Dall'esame colorimetrico risulta che la conservazione dei globuli comincia nella soluzione all' 1,2; il punto di conservazione completa non si può determinare, perchè anche la soluzione al 20 per mille presenta una colorazione rosea ultra-leggierissima, indizio di scarsa quantità di Hb sciolta nel sangue, forse in seguito alla defibrinazione.

Esperienza B. Medesimo sangue, estratto da *ore 312* saturato con CO. Tanto nel sangue puro, che nei miscugli con le solite soluzioni

di NaCl, compresa quella al 20 per mille, non si riesce a trovare alcun globulo colorato ; sono numerosi i nuclei, e le emazie scolorate ; sono numerosissimi i bacteri di varie forme.

Serie VII, 4 luglio 1898. Sangue del cuore di 4 testuggini. Si defibrina e si filtra. Una parte serve subito per determinare la resistenza del sangue fresco (esperienza *A*) il resto, circa 20 cc., si mette in una bottiglia in cui si fanno passare 4·5 litri di CO, nel modo descritto nella Memoria **6**, pag. 30 e seg. Dopo *1 ora*, dalla bottiglia si toglie, con le precauzioni indicate nella Memoria citata, un po' di sangue che viene messo in un vetrino da orologio ; la bottiglia viene tosto rimessa nella ghiacciaia. Il sangue del vetrino serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *B*) ; ne resta un poco che si lascia nel vetrino, e questo si colloca senz'altro nella ghiacciaia. Il giorno 6 il sangue rimasto nel vetrino d'orologio serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *C*). Il giorno 7, il sangue della bottiglia viene trattato di nuovo con eccesso di CO ; esso si presenta fresco, rosso chiaro, con l'odore proprio del sangue di tartaruga, senza alcun accenno a principio di putrefazione. Dalla bottiglia si toglie un po' di sangue che si mette in un vetrino d'orologio, e la bottiglia vien rimessa in ghiacciaia. Il sangue del vetrino serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *D*) ; ne avanza un poco che si lascia nel vetrino e questo si mette senz'altro nella ghiacciaia. Il giorno 8 il sangue avanzato nel vetrino presenta in fondo un deposito di globuli, il siero è colorato in rosso ; si rimescola bene, ha colorito quasi normale e serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *E*) ; nel vetrino avanza un po' di sangue, si rimette nella ghiacciaia. Il giorno 9 il sangue avanzato nel vetrino si presenta di color rosso quasi normale, ha leggiero odore di putrefazione, e serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *F*). Il giorno 11, con le solite cautele, si leva un po' di sangue dalla bottiglia ; ha colorito roseo e odor di prodotti della putrefazione : serve per una nuova prova sulla resistenza (esperienza *G*). Poco dopo nel medesimo giorno si toglie gran parte del sangue dalla bottiglia, si centrifuga per circa $^1/_2$ ora, si toglie un po' di siero (colorato intensamente in rosso) e la poltiglia globulare che resta serve per una prova sulla resistenza (esperienza *H*) ; la bottiglia si rimette nella ghiacciaia. Il giorno 25 il sangue conservato sempre nella ghiacciaia viene esaminato di nuovo (esperienza *I*).

TABELLA I. — **Settima serie di esperienze.**

Tipi	*Soluzioni di NaCl corrispondenti ai vari tipi Esperienze*						*Differenze nel titolo delle soluzioni di Na Cl dell'esperienza* A *e dell'esperienze seguenti*				
	A	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*	*B*	*C*	*D*	*E*	*F*
a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*	*g*	*h*	*i*	*l*	*m*	*n*
9	1	1	1.4	1	1.4	1.4	0	— 0.2	0	— 0.4	— 0.4
8	1.4	1.4	1.6	1.5	1.8	2.3	0	— 0.2	— 0.1	— 0.4	— 0.9
7	1.5	1.5	1.8	1.8	1.9	2.6	0	— 0.3	— 0.3	— 0.4	— 1.1
6	1.7	1.7	1.9	1 9	2.1	2.8	0	— 0.2	— 0.2	— 0.4	— 1.1
5	1.8	1.8	2.1	2.1	2.2	3	— 0.1	— 0.3	— 0.3	— 0.4	— 1.2
4	2	2.1	2.2	2.2	3	3.4	— 0.1	— 0.2	— 0.2	— 1.0	— 1.4
3	2.2	2.3	2.6	2.6	. .	. .	0	— 0.4	— 0.4	. .	. .
2	2.6	2.6	3.4	3.4	. .	. .	0	— 0.8	— 0.8	. .	. .
1	3.4	3.4	4	4	. .	. .	. .	— 0.6	— 0.6	. .	. .
				Medie . . .			**— 0.09**	**— 0.37**	**— 0.32**	**— 0.50**	**— 1.0**

Esperienza A. Sangue fresco. Si usano le soluzioni di NaCl dall'1 al 3, 4, e quella al 20 per mille. Centrifugazione ed esame colorimetrico. I risultati, regolari, senza alcuna anomalia servono per la costruzione di una grafica, che qui si tralascia, dalla quale si calcolano i dati numerici riportati nella colonna *b* della Tab. I. Anche la soluzione al 20 per mille è colorata ultra-leggerissimamente in citrino, fatto questo che indica che nel sangue fresco e defibrinato si conteneva già qualche traccia di Hb sciolta.

Esperienza B. Medesimo sangue fresco, saturo di CO, estratto da *1 ora.* Si usano le medesime soluzioni di NaCl dell'esperienza precedenti, e le stesse manualità. I risultati, normali e senza alcuna anomalia, sono nella colonna *c* della Tab. I: verso la maggior parte delle soluzioni, e così anche rispetto a quella al 20 per mille, questo sangue si comportò come quello fresco e normale dell'esperienza precedente; verso qualche soluzione si ebbe leggierissima diminuzione di resistenza. Dalla colonna *h* della Tab. I, risulta che le differenze furono corrispondenti ad un aumento nel titolo, della soluzione isotonica di NaCl, del 0.1 per mille, sicchè la media delle variazioni del

titolo delle soluzioni di NaCl corrispondenti a tutti i 9 tipi sarebbe solo dell'0,09 per mille; cifra che serve di indice della leggierissima diminuzione di resistenza che si ha nel sangue saturato con CO e lasciato fuori dell'organismo per 1 ora.

Esperienza C. Medesimo sangue trattato con CO ed estratto da *52 ore;* si usano le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza *A* (e inoltre una al 3,8 e una al 4,2 per mille), e le stesse manualità. I risultati sono riportati nella colonna *d* della Tab. I; per la soluzione al 20 per mille vale quanto si è detto per l'esperienza *A*. Nella colonna *i* sono riportate le differenze tra le soluzioni di NaCl corrispondenti ai medesimi tipi, nel caso del sangue della esperienza *A* e dell'esperienza *C*.

Esperienza D. Medesimo sangue saturo con CO, estratto da 78 *ore*. Si usano le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente, e le medesime manualità. I risultati, sempre regolari e senza alcuna anomalia, sono riportati nella colonna *e* della Tab. I; per la soluzione al 20 per mille vale quanto si è detto per l'esperienza *A*, vale a dire che anche essa ha una colorazione citrina ultra leggierissima. Nella colonna *l* sono riportate le differenze tra i risultati dell'esperienza *A* e di questa esperienza. La media della differenza nei titoli delle soluzioni è di *0,32* per mille, mentre per il caso del confronto tra i dati della esperienza *A* e dell'esperienza *C* la differenza era di 0,37 per mille. La diminuzione quindi della resistenza dei globuli sarebbe maggiore per il sangue dell'esperienza *C* (sangue estratto da 52 ore), che per quello dell'esperienza *D* (estratto da 78 ore), questa apparente anomalia si spiega facilmente ricordando che per l'esperienza *C* si usò sangue avanzato dall'esperienza *B* e lasciato a sè in ghiacciaia in contatto libero con l'aria dell'ambiente, in un vetrino d'orologio, mentre per l'esperienza *D* servì sangue che era sempre accuratamente conservato in bottiglia chiusa, e in presenza di eccesso di CO.

Esperienza E. Medesimo sangue trattato con CO, estratto da *102 ore*. Si usano le medesime soluzioni indicate per l'esperienza *C*, e le medesime manualità. I risultati, sempre regolari e senza alcuna anomalia sono riportati nella colonna *f* della Tab. I. La soluzione al 20 per mille era colorata leggierissimamente in roseo, indizio questo di aumentata quantità nell' Hb già sciolta nel sangue. Nella colonna *m* sono notate le differenze tra i risultati dell'esperienza *A* e di questa esperienza; a tali differenze bisogna naturalmente dare solo un valore relativo, ricor-

dando che una parte della maggior colorazione delle soluzioni di NaCl doveva riferirsi all'Hb già libera nel sangue (*).

Esperienza F. Medesimo sangue trattato con CO, estratto da *125 ore.* Si usano le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza *C* (e inoltre una al 4,6 per mille) e le medesime manualità. I risultati, sempre regolari e senza alcuna anomalia, sono riportati nella colonna *g* della Tab. I. Anche la soluzione al 20 per mille era colorata leggerissimamente in roseo; il colore era un po' più intenso di quello della soluzione al 20 per mille dell'esperienza precedente. Nella colonna *n* sono notate le differenze tra i risultati dell'esperienza *A* e di questa esperienza; anche per esse bisogna ripetere le riserve indicate per l'esperienza precedente.

Esperienza G. Medesimo sangue saturo di CO, estratto da *148 ore.* Si usano le soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente, e le medesime manualità. Dall'esame delle soluzioni centrifugate risulta : per le soluzioni dall'1,4 al 4,6 per mille, liquido limpido, trasparente, egualmente roseo, nessun residuo globulare in fondo ; per la soluzione al 20 per mille, liquido colorato un po' meno intensamente, e in fondo scarsissimo residuo.

Esperienza H. Medesimo sangue trattato con CO, estratto da *150 ore.* Si usano le seguenti soluzioni di NaCl :

4, 5, 6, 7, 10, 12, 14, 20 per mille.

Per l'esame delle soluzioni si usano le manualità indicate nelle esperienze precedenti ; inoltre, finita la centrifugazione e notati i risultati del confronto colorimetrico. si mescola di nuovo il liquido col residuo dal fondo, e senza alcuna ulteriore diluzione, si esaminano al microscopio i vari miscugli. Tanto dall'esame colorimetrico che da quello microscopico si ebbero risultati regolari, senza alcuna anomalia, e precisamente : aumento progressivo del numero dei globuli rossi ben conservati, dalla soluzione di NaCl al 4 per mille, alla soluzione al 20 per mille. Nella soluzione al 4 per mille, i globuli rossi ben conservati per forma e colorito erano rarissimi e aumentarono leggermente e gradatamente nelle soluzioni al 5-6-7 per mille ; nella soluzione al 10 per mille erano in numero discreto, e aumentarono leggermente e gradatamente nelle soluzioni al 12-14 per mille ; nella soluzione al

(*) Intorno a questa causa d'errore che si può presentare nel metodo colorimetrico di determinare la resistenza del sangue, veggasi la nota I a pag. 48 della Memoria 5.

20 per mille erano molto numerosi. Nel sangue puro e nei miscugli con le soluzioni di NaCl sono numerosissimi i bacteri di varie forme.

Esperienza I. Medesimo sangue saturo di CO, estratto da *510 ore.* Si usano le soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente e le stesse manualità. Tanto dall'esame colorimetrico che da quello microscopico delle soluzioni e del sangue puro, risulta che i globuli rossi sono completamente distrutti. Non si vedono nemmeno i nuclei circondati da protoplasma incoloro, che erano abbondanti nel sangue dall'esperienza precedente.

Serie VIII, 13 luglio 1898. — Si leva il sangue dal cuore a 4 testuggini ; si defibrina e si filtra. La maggior parte si tratta con eccesso di CO, come si è detto per il sangue della serie precedente, un'altra parte si conserva in tubo chiuso, in presenza di canfora che per altro non è in contatto diretto col sangue. L'una e l'altra parte si tengono sempre nella ghiacciaia.

Tabella II. — **Ottava serie delle esperienze.**

Tipi	*Soluzioni di NaCl corrispondenti ai vari tipi Esperienze*			*Diff. nel titolo delle soluz. dell'esp. A e dell'esp. seguenti*	
	A	*B*	*C*	*B*	*C*
a	*b*	*c*	*d*	*e*	*f*
9	1	1.4	1.8	— 0.4	— 0.8
8	1.4	1.8	2.2	— 0.4	— 0.8
7	1.6	1.9	2.3	— 0.3	— 0.7
6	1.7	2	2 4	— 0.2	— 0.7
5	1.9	2 1	2.5	— 0.1	— 0.6
4	2	2.1	2.6	0	— 0.8
3	2.2	2 2	3	0	— 1.0
2	2.4	2.4	3.4	0	— 1.1
1	2.7	2.7	3.8	0	. .
		Medie. . . .		**— 0.02**	**— 0.78**

Esperienza A. Sangue estratto da *76 ore* ; si presenta come normale tanto per aspetto, che per colore ed odore. Si usano le soluzioni di NaCl dall' 1 al 5, e quella al 20 per mille, e le manualità indicate

per le esperienze precedenti. I risultati, regolari e senza alcuna anomalia, sono riportati nella colonna *b* della Tab. II. Per la colorazione ultra-leggierissimamente citrina della soluzione al 20 per mille, vale esattamente quanto si è detto a proposito dell'esperienza *A* della serie precedente.

Esperienza B. Medesimo sangue estratto da *125 ore*; si presenta come normale, tanto per aspetto, che per colore ed odore. Si usano le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente, e le stesse manualità. I risultati, sempre regolari e senza alcuna anomalia, sono riportati nella colonna *c* della Tab. II. Per la colorazione della soluzione al 20 per mille, vale quanto si è detto per l'esperienza precedente. Nella colonna *e* della medesima tabella sono riportate le differenze tra i risultati dell'esperienza *A*, e di questa esperienza.

Esperienza C. Medesimo sangue, estratto da *221 ore*; si presenta come si è detto per l'esperienza precedente. Si usano le solite soluzioni di NaCl e le solite manualità. I risultati, sempre regolari e senza alcuna anomalia, sono riportati nella colonna *d* della Tab. II. Anche la soluzione al 20 per mille era colorata leggierissimamente in citrino, indizio di aumentata emolisi. Nellla colonna *f* della medesima tabella sono riportate le differenze tra i risultati dell'esperienza *A* e di questa esperienza; anche per esse bisogna ripetere le riserve indicate per alcune delle esperienze precedenti.

Esperienza D. Medesimo sangue, estratto da *366 ore*; si presenta di colore oscuro, di odore nauseante. Si usano le medesime soluzioni di NaCl indicate per l'esperienza precedente, e le stesse manualità. Dall'esame microscopico di queste soluzioni, e del sangue puro, risulta che i globuli rossi sono completamente distrutti, mentre sono numerosissimi i bacteri di varie forme.

Esperienza E. Medesimo sangue, estratto da *196 ore*, conservato in presenza di canfora; si presenta come quello dell'esperienza precedente. Si ripetono le prove indicate per l'esperienza precedente, coi medesimi risultati, anche per quanto riguarda la presenza dei bacteri.

IV. RIASSUNTO DEI RISULTATI.

Per maggior chiarezza nella esposizione, tratteremo dapprima dei risultati relativi al sangue degli uccelli, e in seguito dei risultati relativi al sangue delle anguille e delle testuggini.

A) Sangue degli uccelli.

Sempre per la chiarezza nella esposizione, prenderemo in esame prima il comportamento del sangue freschissimo normale, ed in seguito il comportamento del sangue più o meno *vecchio*, o trattato con CO.

α) Comportamento del sangue normale.

Intorno a questo punto si trovano materiali nelle esperienze *A* delle serie I, III e IV. Nella serie I si trattava di sangue di pollo, nella III di gallina, nella IV di piccione. In tutte le esperienze il sangue si tolse dal cuore, e, prima delle prove sulla resistenza, era stato defibrinato e filtrato su garza.

Riguardo alla cosiddetta " resistenza " dei globuli rossi verso le soluzioni di NaCl di diversa concentrazione, risulta che per il sangue di pollo o di gallina la conservazione dei globuli rossi comincia verso le soluzioni ancora un po' più diluite di quella al 2 per mille (esperienza *A*, serie III), mentre per il sangue di piccione la conservazione comincia solo verso la soluzione al 2,3 ; la conservazione completa dei globuli di pollo si ha nelle soluzioni al 4-4,8 ; diamo queste cifre tanto per aggiungere questi dati a quei pochi che si trovano nella letteratura fisiologica sul medesimo argomento, e per dare un' idea delle variazioni individuali che si possono riscontrare.

Riguardo al comportamento verso la così detta " legge della scala cromatica, " risultato costante e senza alcuna minima eccezione fu l'assoluta mancanza di qualsiasi anomalia.

β) Comportamento del sangue vecchio.

L'esame della resistenza del sangue fu ripetuto ad epoche successive dall'estrazione dal cuore ; prenderemo dapprima in considerazione il sangue estratto da minor tempo, e poi quello più *vecchio*.

a) Sangue estratto da 28-30 ore.

Nella serie I, esperienza *B*, il sangue (di pollo) era estratto da *28 ore*, nella serie III, esperienza *B*, il sangue (di gallina)

era estratto da *30 ore*, in entrambi i casi il sangue era conservato nella ghiacciaia, e (nel 2° caso) si presentava di colore poco più oscuro del normale, e di odore normale. I risultati sono i seguenti :

1. Nel sangue puro non era constatabile, coi metodi di esame indicati, presenza di Hb già sciolta, quindi l'emolisi nel sangue estratto dal tempo suddetto, o non si era ancora iniziata o rimase limitatissima.

2. Nel sangue estratto dal tempo suddetto, si ha in generale una piccola diminuzione della resistenza dei globuli; diminuzione che nell'esperienza *B* della serie III equivaleva ad una differenza del 0,4 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl. Nell'esperienza *B* della serie II si ebbe un leggiero aumento della resistenza rispetto alla soluzione al 4,40 per mille, mentre la resistenza era leggiermente diminuita verso le soluzioni al 3,2-3,6 per mille.

3. Non si ebbe da osservare la minima anomalia rispetto alla così detta " legge della scala cromatica ".

b) Sangue estratto da 51-72 ore.

Servono per questo paragrafo le esperienze *C* e *D* della serie I, sangue di pollo, conservato nella ghiacciaia, estratto, rispettivamente, da *51* e da *72 ore*. In entrambe le esperienze il sangue aveva odore normale, colore un po' più scuro del normale, e assumeva color rosso più chiaro se veniva agitato all'aria. Le prove della resistenza si fecero col sangue così ossigenato, coi seguenti risultati :

1. Riguardo all'emolisi nel sangue puro, per l'esperienza *C* si ebbero i medesimi risultati ottenuti sul medesimo sangue estratto solo da *28 ore* (esperienza *B*), vale a dire che la distruzione dei globuli non era ancora incominciata (dopo *51 ora*) o non apprezzabile coi metodi di esame adoperati; nell'esperienza *D* (sangue estratto da *72 ore*) l'emolisi era già discreta.

2. Riguardo alla resistenza dei globuli : nel caso dell'esperienza *C* non si ebbe (rispetto all'esperienza *B* col medesimo sangue, estratto da *28 ore*) alcuna variazione nella resistenza; nel caso dell'esperienza *D* non si ebbe alcuna variazione della

resistenza rispetto alle soluzioni dal 2 al 3,6 per mille; rispetto alle soluzioni più concentrate i risultati sono incerti.

3. Non si ebbe da osservare la minima anomalia rispetto alla così detta " legge della scala cromatica „ e questo vale tanto per i globuli rossi del sangue dell'esperienza *C* in cui l'emolisi non era principiata, quanto per le emazie superstiti dell'esperienza *D* in cui l'emolisi era già discreta.

c) *Sangue estratto da 150-223 ore.*

Servono per questo paragrafo le esperienze *B* e *C* della serie IV (sangue di gallina estratto rispettivamente da *150* e *168 ore*) e *C* della serie III (sangue di pollo estratto da *ore 221*); le chiameremo per brevità: esperienze α, β e γ.

In tutti i casi si trattava di sangue conservato nella ghiacciaia. In tutti e tre i casi le prove solite colorimetriche non diedero risultati evidenti per l'avanzatissima emolisi e si dovette ricorrere all'esame microscopico dei miscugli di sangue con le soluzioni di NaCl variamente concentrate. Risultati principali:

1. Nelle esperienze α e β le emazie che erano sfuggite all'emolisi avvenuta nel sangue puro (che chiameremo brevemente " emazie superstiti „) erano conservate in gran numero nella soluzione di NaCl al 20 per mille, mentre erano completamente decolorate nelle soluzioni al 2-5 per mille; tali emazie superstiti dovevano quindi, per conservarsi, richiedere una soluzione di NaCl molto più concentrata di quella al 5 per mille. Nell'esperienza γ, i globuli rossi erano completamente decolorati nelle soluzioni di NaCl più diluite di quella al 3,4 per mille, e conservati in numero progressivamente crescente nelle soluzioni di NaCl progressivamente più concentrate.

2. Anche per queste esperienze bisogna ammettere, sulla base dei reperti microscopici sopra citati, che anche dopo un processo avanzatissimo di emolisi nel sangue lasciato a sè, le emazie " superstiti „ si comportano regolarmente verso la legge della scala cromatica, quando vengono trattate con soluzioni di NaCl progressivamente concentrate.

B) Sangue d'anguilla.

Si tratta delle esperienze *A*, *B*, *C*, *D* della serie II, in cui il sangue era freschissimo o estratto da 28, 80 e 344 ore, e conservato sempre nella ghiacciaia. Dopo 80 ore il sangue aveva odore normale, e colore un po' più scuro del normale; mentre dopo ore 344 era d'odor fetido, e di colore molto scuro. Risultati principali:

1. Riguardo al processo d'emolisi nel sangue puro, si riscontrò leggierissima distruzione dei globuli nel sangue estratto da 28 ore, distruzione che non aumentò in modo apprezzabile nel sangue estratto da 80 ore, mentre fu copiosissima nel sangue estratto da 344 ore;

2. riguardo alla resistenza dei globuli, si ebbe una leggiera diminuzione di resistenza (equivalente in media al 0,3 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl) nel sangue estratto da 28 ore; in seguito la resistenza si mantenne immutata nel sangue estratto da 80 ore. Nel sangue estratto da 344 ore, dalle osservazioni microscopiche, risulta completa decolorazione delle emazie nelle soluzioni all' 1,2-4,8 per mille (nel sangue freschissimo, esperienza *A*, i globuli cominciarono a conservarsi nella soluzione al 2,20 per mille), conservazione di scarso numero di globuli nella soluzione al 6, e di numero rapidamente crescente nelle soluzioni al 7 e al 20 per mille.

3. Riguardo alla legge della scala cromatica, gli esami colorimetrici e i reperti microscopici non hanno indicato la minima anomalia.

C) Sangue di testuggine *(Emys europaea)*.

Rientrano in questo paragrafo le esperienze delle serie V a VIII, che bisogna suddividere subito in 2 gruppi, giacchè nella serie V si studiò il sangue lasciato a sè senza alcun trattamento, mentre nelle altre serie il sangue fu conservato saturo di CO.

I risultati delle prove sul sangue freschissimo si possono riassumere nei seguenti punti:

1. Il sangue freschissimo può presentare traccie di Hb già sciolta, forse in seguito alla defibrinazione;

2. Le emazie cominciano a conservarsi nelle soluzioni all' 1,2-1,6, e sono completamente conservate nelle soluzioni di NaCl al 2,6-3 per mille;

3. Non si ha il minimo accenno ad anomalia rispetto alla legge " della scala cromatica ".

α) Sangue della serie V.

Fu determinata la scala della resistenza del sangue freschissimo (esperienza *A*) e del sangue conservato in ghiacciaia per 20 ore. Dopo questo tempo nel sangue non era riscontrabile accenno ad emolisi, e le emazie presentarono una leggierissima diminuzione sulla resistenza verso le soluzioni all' 1,4-1,6, mentre presentavano resistenza immutata rispetto alla soluzione al 2,6 per mille e seguenti.

β) Sangue trattato con CO.

In queste serie di esperienze (VI, VII e VIII) il sangue veniva inoltre conservato sempre nella ghiacciaia.

Prenderemo successivamente in esame il sangue lasciato a sè in tempi diversi, progressivamente crescenti. - Intanto, l'azione esercitata dal trattamento con CO sulla resistenza del sangue ancora fresco è dimostrata dall'esperienza *B* della serie VII in cui una parte del sangue freschissimo fu trattata con CO, e dopo 1 ora dall'estrazione dal cuore fu sottoposta alle prove sulla resistenza. In tale esperienza si ebbe (in confronto col sangue freschissimo normale) una diminuzione leggierissima della resistenza, equivalente in media al 0,09 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl, diminuzione da attribuire esclusivamente al trattamento con CO, giacchè, come risulta dalle esperienze sopra riportate sul sangue di pollo e di anguilla e dalla larghissima pratica fatta con sangue di mammiferi, il sangue può conservarsi *in vitro* anche per 10-15-20 ore senza subire alcuna diminuzione nella resistenza dei globuli.

a) Sangue estratto da 52-78 ore.

Rientrano in questo paragrafo le esperienze *C* e *D* della serie VII, ed *A* della serie VIII, nelle quali il sangue era

estratto, rispettivamente, da 52-78-76 ore; le chiameremo per brevità α, β, γ. I risultati principali sono:

1. Riguardo all'emolisi nel sangue puro, in tutte e tre le esperienze non si ebbe alcun aumento della quantità di Hb sciolta che già il sangue freschissimo conteneva in scarsissima quantità;

2. Riguardo alla resistenza dei globuli, le esperienze α e β hanno indicato che essa diminuisce nel sangue estratto da 52-76 ore di un grado equivalente presso a poco al 0,35 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl (in confronto al sangue freschissimo); per l'esperienza γ non si possono indicare dati analoghi, perchè non fu determinata la resistenza del sangue normale, per altro dalle cifre della colonna *b* della Tab. II risulta che la resistenza delle emazie di quel sangue conservato da 78 ore in presenza di eccesso di CO non era molto diversa da quella delle emazie del sangue normale dell'esperienza α suddetta, e dell'esperienza *A* della serie VI. Così per l'esperienza γ si sarebbe avuta una diminuzione della resistenza o nulla o trascurabile (non si può pensare ad influenza di grandi differenze individuali perchè tanto nella serie VII che nella VIII si studiò il sangue preso ciascuna volta dal cuore di 4 testuggini, e quindi le differenze individuali dovevano in gran parte compensarsi a dare una media pressochè costante), ed infatti anche il sangue si presentava di colore ed odore normale; questa differenza rispetto al comportamento del sangue della serie VII, è dovuto essenzialmente al fatto che il sangue della serie VIII fu conservato sempre saturo di CO, in bottiglia chiusa, e in presenza di eccesso di CO, mentre nel caso della serie VII le esperienze richiesero trattamento diverso del sangue, come è indicato dettagliatamente nel capitolo III.

3. Riguardo alla legge " della scala cromatica " vale la solita conclusione, dell'assenza assoluta di anomalie.

b) Sangue estratto da 102-150 ore.

Rientrano in questo paragrafo le esperienze *E*, *F*, *G*, *H* della serie VII, e *B* della serie VIII, in cui il sangue era conservato, rispettivamente, da ore 102, 125, 148, 150, 125. Il com-

portamento del sangue presentò grandi differenze nelle due serie (VII e VIII) di esperienze, analogamente a quanto risultò anche dal paragrafo precedente (resistenza dei globuli dell'esperienza γ). Il sangue della serie VII presentò una emolisi più rapida e più intensa di quella della serie VIII, in modo che mentre nella serie VII il sangue era inadatto alle prove colorimetriche dopo ore 148 (esperienza *F*), nella serie VIII era conservato abbastanza bene anche dopo ore 221. I risultati più interessanti da citare in questo paragrafo sono i seguenti:

1. Riguardo all'emolisi, nel sangue della serie VII si aveva discreta quantità di Hb libera dopo ore 102 (esp. *E*) ; tale quantità aumentò rapidamente nelle esperienze fatte dopo ore 125 (esp. *F*), 148 (esp. *G*) e 150 (esp. *H*), tanto che nelle esperienze *G* e *H* il sangue non era più adatto alle prove colorimetriche. Nel sangue della serie VIII, dopo 125 ore (esp. *B*) l'emolisi era ancora molto limitata.

2. Riguardo alla resistenza delle emazie, nella serie VII si ebbe un progressivo aumento nella diminuzione della resistenza. Così in confronto col sangue freschissimo, nell'esperienza *E* (sangue estratto da 102 ore) la diminuzione di resistenza equivaleva a 0,5 per mille nel titolo delle soluzioni di NaCl, nell'esperienza *F* (sangue estratto da 125 ore) la diminuzione equivaleva all'1 per mille. Nelle esperienze *G* ed *H* si dovette ricorrere all'esame microscopico, e nel caso dell' esperienza *H* (sangue estratto da 150 ore) si ebbe numero scarso di globuli conservati nella soluzione al 4 per mille. Invece nella serie VIII, dopo 125 ore (esperienza *B*) il sangue (come risulta dalla Tabella II) presentava una resistenza un po' superiore a quella presentata dal sangue della serie VII nella esperienza *C* (sangue estratto da 52 ore).

3. Riguardo alla legge " della scala cromatica " tanto i confronti colorimetrici che i reperti microscopici non mostrarono alcun minimo accenno ad anomalia.

c) *Sangue estratto da 221 ore.*

Si tratta dell'esperienza *C* della serie VIII, in cui il sangue estratto da ore 221, si presentava ancora come normale tanto per odore che per colore. L'emolisi nel sangue puro era ancora

limitatissima; la resistenza delle emazie si presentava un po' superiore a quella del sangue (estratto da 125 ore) dell'esperienza *F* della serie VII. Nella scala cromatica nessuna anomalia.

d) Sangue estratto da 312 e più ore.

A questo paragrafo appartengono le esperienze *B* della serie VI, *I* della serie VII, *D* della serie VIII, nelle quali il sangue era estratto, rispettivamente da 312, 512 e 366 ore. Vi aggiungiamo anche il sangue della esperienza *E* della serie VIII, benchè si tratti di sangue estratto solo da 196, non conservato con CO, ma in presenza di presenza di pezzetti di canfora. In tutte queste esperienze, l'emolisi era già completa, e non si riusciva a trovare più alcuna emazia con colore ed aspetto normali.

V. CONCLUSIONI.

Le conclusioni alle quali conducono le esperienze sopra riassunte sono analoghe a quelle indicate nelle Memorie **3** e **4** relative alla resistenza dei globuli non nucleati del sangue di mammiferi. Anche per il sangue degli uccelli, dei pesci e dei rettili, estratto dal cuore o dai vasi sanguigni e lasciato a lungo a sè *in vitro* senza precauzioni asettiche, ad una temperatura uguale a 0^0 o di poco superiore, si hanno i risultati seguenti:

1. Il processo di emolisi nel sangue puro comincia dopo le 24 ore, si conserva limitato dopo 48-72 ore, ed in seguito procede rapidamente, in modo che dopo 150-200 ore gran parte dei globuli rossi ha perduta l'emoglobina.

2. In modo analogo diminuisce la resistenza dei globuli rossi verso le soluzioni di NaCl: la diminuzione è nulla o leggierissima dopo 24 ore; è leggiera dopo 48-72-80 ore; aumenta rapidamente in seguito, di modo che dopo 150-300 ore le emazie cedono tutte la loro Hb alle soluzioni di NaCl inferiori al 4-5 per mille, e cominciano a conservarsi in numero progressivo crescente nelle soluzioni al 5-6-7 per mille.

3. Il sangue saturo di CO (conservato anche in eccesso di CO) si comporta in modo simile al sangue (di mammifero, esperienze della Memoria **4**) estratto e conservato asetticamente;

vale a dire che esso presenta più a lungo i caratteri esteriori normali, processi di emolisi e diminuzione della resistenza più lenti e più limitati. Così l'emolisi era trascurabile anche dopo 76-78 ore, ed era limitatissima anche dopo 125-221 ora (esperienze della serie VIII, sangue di tartaruga), in seguito deve aumentare rapidamente in modo che dopo verso 300 ore, tutti i globuli hanno perduto la loro Hb. Parallelamente si comporta la diminuzione della resistenza delle emazie: per azione del trattamento con l' CO si ha leggierissima diminuzione della resistenza anche nel sangue freschissimo, in seguito la resistenza diminuisce molto lentamente in modo che le emazie possono ancora dopo ore 221 resistere per la massima parte alla soluzione di NaCl al 3,8 per mille (esperienza *C*, serie VIII).

4. Per quanto riguarda il comportamento dei globuli verso la così detta " legge della scala cromatica „ non si ebbe il minimo accenno ad anomalia in alcuna nelle esperienze fatte tanto con sangue conservato puro, che con quello saturo di CO. Nel sangue di pollo non si aveva alcuna anomalia, nemmeno quando, dopo 150-221 ore, il processo di emolisi era avanzatissimo: e così nel sangue di testuggine conservato per ore 221 saturo di CO. Quindi nemmeno per i globuli rossi nucleati si può ammettere, per quanto riguarda i fenomeni rientranti nella così detta " resistenza, „ alcuna differenza fondamentale tra quelli lasciati *in vitro* per 24-48 ore, e quelli lasciati per 72 o più ore.

LAVORI CITATI

(1) G. Manca. - *Influenza della fatica muscolare sulla resistenza dei globuli rossi del sangue.* - Sperimentale, 1895, anno XLVIII, Sezione biologica. - Arch. ital. de Biologie, T. XXIII, 1895, pag. 317.

(2) G. Manca. - *Influenza della cocaina sulla resistenza dei globuli rossi del sangue.* - Sperimentale, 1895, anno XLVIII Sez., biologica. - Arch. ital. de Biologie, T. XXIII, 1895, pag. 391-408.

(3) G. Manca. - *Intorno alla progressiva diminuzione della resistenza del sangue dopo la sua estrazione dall'organismo.* - Arch. italiano di clinica medica, 1896.

(4) G. MANCA. - *La legge dei coefficenti isotonici nei globuli rossi del sangue conservato fuori dell'organismo.* - Archivio per le Scienze mediche, XX, 1896.

(5) G. MANCA. - *Esperienze intorno all'azione del cloroformio sulle proprietà osmotiche dei globuli rossi.* - Atti del R. Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, Tomo VIII, Serie VII, 1897, pag. 1348-1416. - Arch. di Farmacologia e Terapeutica, vol. VII, 1898. - Arch. ital. de Biologie, T. XXIX, 1898. (Le nostre citazioni si riferiscono alle pagine dell'estratto dell'edizione dell' Istituto Veneto).

(6) G. MANCA. - *Ricerche intorno alle proprietà osmotiche dei globuli rossi del sangue conservato a lungo fuori dell'organismo.* - Atti del R. Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti, vol. VIII, Serie VII, 1897, pag. 1417-1516. - Archivio per le Scienze mediche, XXII, 1898. - Arch. ital. de Biologie, T. XXX, 1898. (Le nostre citazioni si riferiscono alle pagine dell'estratto dell'edizione dell' Istituto Veneto).

(7) H. DE VRIES. - *Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft.* - Pringsheim's Jahrbüch. für wissensch. Botanik, 1884, XIV, pag. 427 e seg.

(8) L. MALASSEZ. - *Sur les solutions salées dites physiologiques.* - Compt. Rend. de la Soc. de Biologie de Paris, 1896, p. 504. (Noi ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera : « Laboratoire d' Histologie du Collége de France. Travaux des années 1896-1897. » Paris, 1899, pag. 59).

(9) L. MALASSEZ. - *Sur l'alterabilité des globules rouges.* - Compt. Rend. de la Soc. de Biol., de Paris, 1897, pag. 203. (Noi ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera citata al n. 8 : « Laboratoire d'Histologie, etc. », pag. 73.

(10) L. MALASSEZ. - *A propos de l'action des solutions salines sur les globules rouges, réponse à M. Mayet.* - Compt. Rend. de la Soc. de Biol., de Paris, 1897, p. 301. (Ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera citata al n. 8, pag. 78).

(11) VAQUEZ et MARCANO. - *Altération de la résistance du sang dans l'hémoglobinurie paroxytique.* - Compt. Rend. de la Soc. de Biol. de Paris, 1896, pag. 115. (Ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera citata al n. 8, pag 146).

(12) VAQUEZ et MARCANO. - *Des modification des éléments figurés du sang dans un cas d' hémoglobinurie.* - Arch. de Medec. Experim., 1896, pag. 49. (Noi ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera citata al n. 8, pag. 156).

(13) VAQUEZ. - *Recherches sur l' hématolyse in vitro.* - Compt. Rend. de la Soc. de Biol. de Paris, 1897, pag. 990. (Noi ci riferiamo alla ristampa contenuta nell'opera citata al n. 8, pag. 164).